

**SISTEMÀTICA I EVOLUCIÓ**  
**EN EL MÓN DELS PROCARIOTES :**  
**DADES APORTADES PER L'ESTUDI DELS ÀCIDS NUCLEICS**  
**DELS BACTERIS DEL GRUP *BDELLOVIBRIO* \***

per FRANCESC TORRELLA i MATEU

Departament de Microbiologia, Facultat de Ciències,  
Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.

**INTRODUCCIÓ**

L'ordenament sistemàtic de les estirps bacterianes s'ha realitzat durant molt de temps seguint les mateixes pautes i tenint en compte les mateixes limitacions teòriques que dirigeixen el treball del sistemàtic dels organismes eucariòtics. Una idea bàsica ha estat agrupar els procariotes sota un nom genèric i un altre d'específic, de manera que la unitat formada tingués el mateix sentit que l'espècie en el món dels eucariotes. La sistemàtica dels éssers superiors unicel·lulars o pluricel·lulars atén sobre tot a les característiques fenotípic-morfològiques dels individus un cop s'han esgotat les possibilitats genètiques de diferenciació i d'agrupament (anàlisi de la reproducció, cariotip, etc.). La importància de les dades fenotípiques, sobretot les de base morfològica, queda minimitzada quan es considera la sistemàtica bacteriana. Podria dir-se que el nivell d'organització procariòtic es distingeix de l'eucariòtic pel fet que l'eficàcia biològica dels

\* **ADVERTIMENT:** Encara que l'estructura d'aquest escrit sigui la d'un article científic, el contingut i la discussió dels resultats s'han exposat amb la idea d'esperonar la discussió més que no pas d'establir conclusions fermes. Crec que aquesta va ser la idea del RECAP-75 a Sta. M.<sup>a</sup> de Poblet i he procurat ésser fidel totalment a aquest esperit.

Fora el meu desig que el lector considerés aquest treball amb punts de vista crítics oberts. No pretenc afirmar coses i tancar discussions. Només plantejo fets i dificultats d'interpretació en un camp; l'evolució dels bacteris, molt poc conegut i, per tant, objecte de moltes hipòtesis i especulacions. Si les dades que presento i el seu tractament serveixen per confirmar o despertar nous punts de vista en algun dels lectors, em donaré per satisfet.

eucariotes es fonamenta en gran part en la seva capacitat de diversificació morfològica. Ben al contrari, l'èxit biològic dels bacteris es basa en la seva capacitat d'adaptació bioquímica. Donada una morfologia, la diversitat fisiològica dels bacteris que la poseeixen és sorprenent.

Tanmateix, la diversificació morfològica dels bacteris no es pot subvalorar. De fet, la consideració de les morfologies bacterianes ha demostrat ser una base ferma per a l'establiment d'alguns grups bacterians. Els caràcters fenotípic-morfològics en la classificació dels bacteris poden fer-se servir a aquest nivell, però la seva escassetat no permet avançar sistemàticament molt més enllà de l'ordenament en grans grups.

Els bacteris, com a grup, ofereixen els caràcters fenotípics a nivell bioquímic més que no pas morfològic. Un cert nombre d'aquests caràcters bioquímics, d'arrel fisiològica la majoria de les vegades, poden ésser estudiats al laboratori. Però aquesta anàlisi de caràcters bioquímics és un arma enganyosa. Per una banda sembla que l'estudi de la base química d'un caràcter d'un ser viu és l'anàlisi més fina del genotip de l'individu i, per tant, d'un valor objectiu més gran. Però per altra banda, la capacitat fisiològica d'un bacteri per metabolitzar cert producte pot dependre d'un sol gen. En canvi, un caràcter morfològic és conseqüència de diversos gens. És a dir, la consideració d'un tret morfològic equival a l'anàlisi d'una considerable massa de genoma, mentre que l'anàlisi d'un caràcter bioquímic pot donar-nos informació només d'un petit fragment de genoma. Naturalment, en aquest tipus de comparacions de trets morfològics s'ha de tenir cura de no confondre caràcters semblants a causa de la convergència amb d'altres que reflecteixen un parentiu genètic.

De tot l'anterior es dedueix que per a obtenir una informació global acceptable del genoma d'un bacteri mitjançant proves bioquímiques cal analitzar el fenotip de molts gens. Aquesta és una tasca llarga i tediosa en el treball de laboratori. Per altra banda quan en la determinació i classificació d'un bacteri no es poden fer servir caràcters morfològics distintius, les proves bioquímiques poden conduir a classificacions que agrupin microorganismes amb els àcids nucleics molt diferents<sup>2</sup>. Immediatament, a l'investigador se li planteja el dubte de si haurà agrupat, basant-se en uns pocs trets fenotípic-bioquímics, una sèrie d'organismes sense cap parentiu filogenètic (1).

Tanmateix, les classificacions de base bioquímica són útils des d'un punt de vista operatiu en molts camps de la microbiologia i el microbiòleg molts cops no pretén més que obtenir una ordenació útil als seus propòsits. MANDEL<sup>12</sup> ho reflecteix ben bé en aquesta frase: «*Igual que amb*

<sup>1</sup> Sempre que en aquest escrit utilitzo els termes «relacions naturals entre organismes» ho faig en el sentit de «relacions derivades d'un parentiu filogenètic».

les cigarretes, una bona espècie i una bona classificació son aquelles que satisfan».

Després d'establir els grups d'éssers vius, el sistemàtic intenta d'ordenar-los segons una classificació natural. En l'estat actual del coneixement del món procariòtic pot ser aventurat de parlar de filogènia bacteriana i per tant de «classificació natural» de bacteris. El coneixement més complet dels sistemes de transmissió genètica en els bacteris pot conduir a una idea ben diferent del que és una classificació natural en els bacteris i en els éssers eucariòtics. Els estudis de laboratori ens indiquen que l'estabilitat d'un genoma bacterià en una població mixta a la natura pot ser molt relativa. Com a factors determinants de canvis en el genoma no solament figuren les mutacions sinó els sistemes de transmissió genètica d'efectes molt més dràstics. La realitat de la conjugació, transformació i transducció bacterianes, i el paper dels profags i plàsmids invita a considerar el genoma dels bacteris com a una molècula de DNA amb un elevat «turnover genètic» des d'un punt de vista evolutiu. Fa uns anys, les consideracions d'aquest tipus participaven d'una elevada dosi de teoria. Tanmateix, els esforços que actualment es porten a terme a fi de verificar la transmissió d'informació genètica a la natura han arribat a resultats positius <sup>11, 16, 30</sup>.

És indubtable que la classificació dels bacteris es necessària sigui o no filogenètica. Al llarg dels anys seixanta s'han desenvolupat una sèrie de tècniques per a l'estudi dels àcids nucleics que tenen molt d'interès per a la sistemàtica bacteriana. Aquests mètodes permeten el càlcul del % molar de guanina i citosina (% GC) del DNA, de la semblança en la seqüència de bases entre dues molècules de DNA o entre una de DNA i una altra de RNA (homologia d'àcids nucleics) i de la grandària del genoma dels bacteris. SNEATH <sup>24</sup> resumeix així les principals dades de les quals pot disposar en l'actualitat un sistemàtic bacterià:

1. *Aspectes fenotípics:*

- Característiques morfològiques.
- Característiques bioquímiques i genètiques.

2. *Aspectes fenètics:*

- Reaccions de tipus serològic entre proteïnes.
- Mesura de l'homologia entre els àcids nucleics.

3. *Aspectes genotípics:*

- Seqüenciació dels aminoàcids de les proteïnes.
- Seqüenciació de les bases dels àcids nucleics.

El treball que s'exposa a continuació tracta la taxonomia d'un grup de bacteris, els bdeHovibrions, i es discuteixen els resultats en el context general de les classificacions de bacteris i de l'evolució en el món procariontic.

Els bdeHovibrions són bacteris parasítics agrupats en el gènere *Bdellovibrio* que parasiten altres bacteris. Són aerobis estrictes, gramnegatius, de morfologia vibriHar, amb un flagell polar provist d'una beina que envolta el cos central del flagell i es continua amb la paret del bacteri. Els *Bdellovibrio* que s'aïllen de la natura (sòls, aigües dolces, mar, etc.) depenen d'un hoste (un altre bacteri) per a la seva existència i per això són anomenats en anglès *host dependents* (HD). Al laboratori s'han seleccionat soques que poden viure en medis de cultiu rics sense necessitat d'infectar un hoste. Aquestes soques reben el nom de *host independents* (HI). L'acció parasítica dels bdeHovibrions es limita a altres bacteris gramnegatius, puix que no són certes les dades referents a bdeHovibrions que ataquen els bacteris grampositius. La figura 1 mostre el cicle vital d'un bdeHovibrió parasític. Aquest cicle comprèn una fase lliure (forma vibrillar), l'atac pròpiament dit (adsorció i digestió de la paret de l'hoste), creixement del paràsit dins l'espai periplasmàtic del bacteri hoste (fase espiriHar), segmentació de l'espiral del bdeHovibrió i síntesi del flagell, i finalment trencament dels restes de l'envoltura cel·lular del bacteri hoste (bdeHoplast) i alliberament dels bdeHovibrions fills infectius. Les figures 2 i 3 són dues micrografies electròniques que mostren la morfologia d'un *Bdellovibrio* típic (fig. 2) i el moment de l'atac del paràsit a l'hoste (fig. 3). El lector interessat en altres detalls de la biologia dels bdeHovibrions pot consultar les revisions de STARR i HUANG<sup>25</sup> i de STARR i SEIDLER<sup>26</sup>.

Per la seva mateixa naturalesa parasítica manca en els bdeHovibrions una part important de la maquinària biosintètica habitual en un eubacteri. Generalment falten molts enzims utilitzats per la degradació dels sucres, la síntesi de les bases dels àcids nucleics i d'altres. Això determina la impossibilitat de fer estudis complets amb les proves bioquímiques d'ús habitual al laboratori. SEIDLER, MANDEL i BAPTIST estudiaren<sup>22</sup> la sistemàtica del grup *Bdellovibrio* mitjançant les homologies entre els àcids nucleics d'algunes soques. Fruit d'aquest treball va ser la distinció de tres espècies acceptades a la vuitena edició del Manual Bergey's de Determinació Bacteriològica<sup>3</sup>.

Totes les soques de *Bdellovibrio* aïllades fins avui dia presenten una identitat quasi absoluta quant a morfologia, estructura i cicle vital. En algun cas, com a *Bdellovibrio* W<sup>4</sup> s'ha descobert que el paràsit pot enquistar-se quan infecta altres bacteris. Això no es coneix d'altres bdeHovibrions, però pot molt ben ser que no s'hagi buscat o no s'hagi trobat

encara la soca hoste adequada. Hi ha alguna altra diferència relativa a l'especificitat de l'hoste, puix que unes soques ataquen preferentment els pseudomonas i d'altres els enterobacteris gramnegatius. Els estudis dels

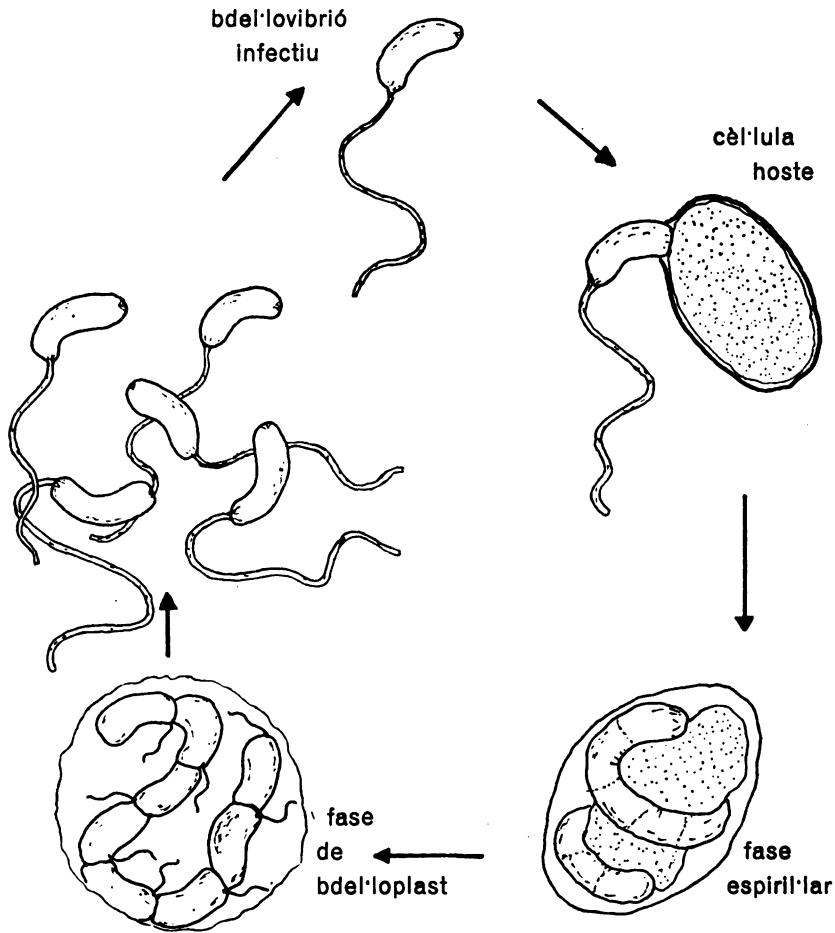


FIG. 1. — Cicle infecciós d'un *Bdellovibrio* HD. Les fases de l'atac es descriuen amb detall al text.

àcids nucleics van revelar que el grup dels bdellovibrió no era tan homogeni com feien suposar la seva morfologia, estructura i cicle vital. En el present treball s'exposen els resultats de l'estudi de les homologies, el % GC i la grandària del genoma de soques ja estudiades i d'altres

aïllades de nou. Els resultats posen de manifest la dificultat de l'estudi de la filogènia bacteriana, àdhuc tenint a les mans les dades de les homolo-

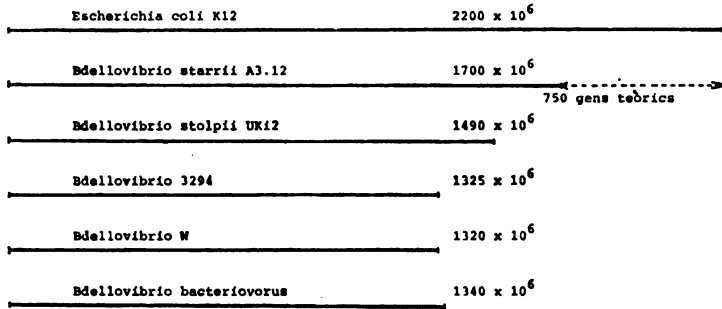


FIG. 4. — Grandària del genoma d'*Escherichia coli* comparat amb el de diverses soques de *Bdellovibrio*.

1 gen ~ 1000 parells de nucleòtids.

Pes molecular mitjà d'un nucleòtid = 331.

(- - -) = diferència de grandària entre genomes.

gies entre els àcids nucleics de les soques comparades. D'altra banda, aquestes dades augmenten el coneixement de la diversitat genotípica dels bacteris del grup *Bdellovibrio*.

## MATERIAL I MÈTODES

### Microorganismes estudiats

Soques de *Bdellovibrio* independents d'hoste (HI): *Bdellovibrio* 100; 109D; W; UK12; A3.12; 3294; 3293. Soques dependents d'hostes (HD): *Bdellovibrio* SP-1; S3; S2; C1; C3; C4. *Escherichia Coli* WP-2; *Spirillum serpens* MW5.

### Lloc d'aïllament de les soques

*Bdellovibrio* 100; 109 i A3.12 foren aïllades de sòls a Califòrnia (USA); *Bdellovibrio* UK12 procedeix de Kentucky (USA); *Bdellovibrio* W fou aïllada a Alemanya; *Bdellovibrio* 3294 i 3293 procedeixen d'aiguamolls de les costes del Japó; *Bdellovibrio* SP-1 fou aïllada per l'autor d'un sòl de conreu de Valls (Alt Camp) i *Bdellovibrio* S2; S3; C1; C3 i C4 d'aigües residuals de Valls.

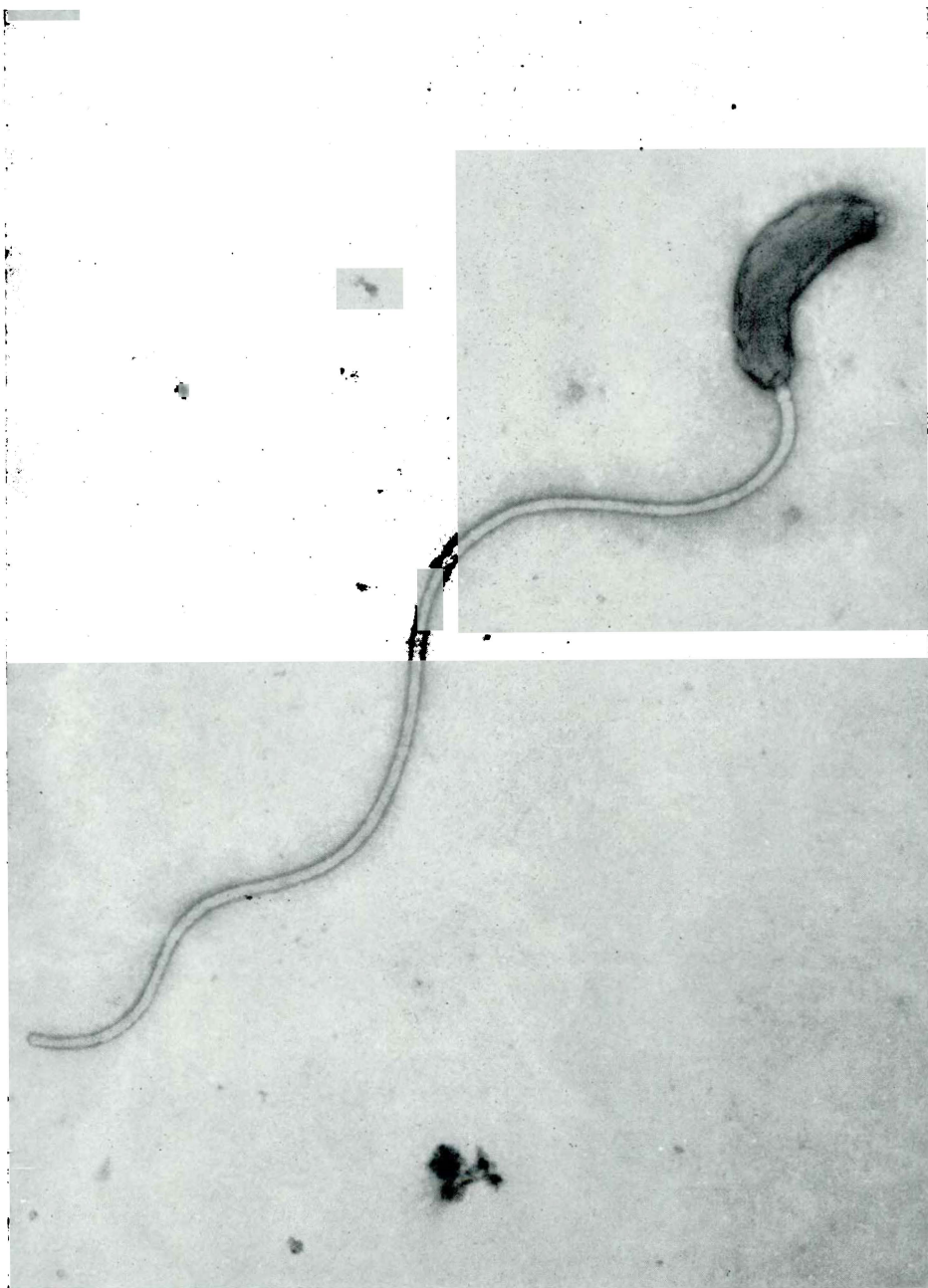


FIG. 2. — Morfologia típica d'una soca de *Bdellovibrio* aïllada d'aigües residuals. Tinció negativa amb acetat d'uranil al 0,5 % ( $\times 37000$ ).



FIG. 3. — AtaBc d'un *Bdellovibrio* a una cèl·lula d'*Escherichia coli*. Tinció negativa amb àcid fosfotúngstic al 1 % ( $\times 38.000$ ).



### *Cultius cel·lulars*

Les soques de *Bdellovibrio* independents d'hoste, *Escherichia coli* i *Spirillum serpens* foren cultivades en mitjà PYE líquid a 30 °C<sup>19</sup>. Les soques dels bdeHovibrions dependents d'hoste varen créixer sobre *Spirillum serpens* en medi NB-10<sup>18</sup> fins que l'observació al microscopi mostrava la destrucció completa de las cèHules del bacteri hoste.

### *Extracció i purificació del DNA*

Les cèHules d'*Escherichia coli* i de *Bdellovibrio* un cop rentades amb tampó foren lisades amb dodecilsulfat de sodi al 2 %. El DNA s'obtingué i purificà mitjançant la modificació del mètode de MARMUR<sup>14</sup> utilitzada per SEIDLER i col·laboradors<sup>21</sup>.

### *Determinació del % molar del GC*

La concentració de guanina i citosina es va determinar per l'obtenció del punt mitjà de fusió (T<sub>m</sub>) de l'àcid nucleic<sup>15</sup>. La fusió del DNA es portà a terme en tampó SSC diluït deu vegades i fent servir com estàndard intern DNA d'*Escherichia coli* WP-2 amb un % GC conegut i igual al 51. Per al càlcul final de la T<sub>m</sub>, la lectura de la densitat òptica a cada temperatura es corregí tenint en compte la dilatació de les cubetes. La fórmula emprada per al càlcul final del % GC fou la de MANDEL et al.<sup>13</sup>.

### *Reassociació del DNA (homologies i grandària del genoma)*

La reassociació es va fer en tampó 3xSSC amb un 20 % de dimetil-sulfòxid (DMSO) segons la tècnica descrita per SEIDLER i MANDEL<sup>21</sup>, mesurant la disminució de la densitat òptica a la cubeta de reacció. El DNA utilitzat es trencà amb una premsa de French a 15 000 psi. Després la mostra es va passar per un filtre de nitrat de cel·lulosa (Millipore de 0,45 µm de porus mitjà i va dialitzar-se durant 24 hores en el tampó esmentat.

Les fórmules emprades per a l'obtenció de l'homologia i de la grandària del genoma així com altres detalls tècnics es troben a SEIDLER i MANDEL<sup>21</sup>. Cal dir que la reacció es va realitzar a una temperatura de T<sub>m</sub>-25 °C. A aquesta temperatura dues cadenes senzilles de DNA poden aparellar-se encara que les seqüències de bases no coincideixin exactament. En canvi, a T<sub>m</sub>-15 °C, temperatura més restrictiva, només les cadenes senzilles de DNA que són idèntiques en seqüència poden arribar a apa-

rellar-se. D'això es dedueix que una manca d'aparellament (reassociació) a  $T_m-25$  °C indica una falta d'homologia entre dos DNA molt més important que el mateix fet a  $T_m-15$  °C.

### RESULTATS

La taula 1 indica el % GC i la nomenclatura taxonòmica de les soques de *Bdellovibrio* estudiades. El % GC varia des de 37 fins 51. El límit inferior està representant per soques aïllades al Japó (37-38 % GC).

TAULA 1. — % GC de les soques de *Bdellovibrio* estudiades i nomenclatura taxonòmica acceptada fins l'any 1972

Soca de <i>Bdellovibrio</i>	% GC	Altres autors <sup>1</sup> % GC	Taxoespècie acceptada
109D	51	51,5	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>
SP-1	50,05	—	—
S <sub>2</sub>	48,09	—	—
S <sub>3</sub>	48	—	—
C <sub>1</sub>	47,9	—	—
C <sub>3</sub>	47,9	—	—
C <sub>4</sub>	47,9	—	—
W	43,7	—	—
A <sub>3,12</sub>	43,46	43,5	<i>Bdellovibrio starrii</i>
UKi <sub>2</sub>	41,77	41,8	<i>Bdellovibrio stolpii</i>
3294	37,38	—	—
3293	38,46	—	—

<sup>1</sup> Seidler et al. (1972).

TAYLOR et al.<sup>20</sup> han aïllat alguns *bdeHovibrions* marins amb un % GC semblant. Hi ha un altre grup de *bdeHovibrions* amb un % GC de 41,5 a 44. Un tercer grup ben definit inclou soques amb un % GC de 49,5 a 51. Algunes de les soques aïllades a Catalunya tenen un % GC lleugerament inferior i igual a 48.

La figura 1 mostra la grandària del genoma de les diferents soques de *Bdellovibrio* comparat amb el d'*Escherichia coli*. El genoma més gran correspon a la soca A<sub>3,12</sub>. Aquest resultat coincideix amb les dades d'altres autors<sup>22</sup>. En conjunt, la grandària del genoma dels *bdeHovibrions* és més

petita que el d'*Escherichia coli*, com correspon a un bacteri parasític en el qual manquen molts enzims de biosíntesi de metabolits cel·lulars.

La taula 2 expressa l'homologia detectada entre DNA de parells de soques de *Bdellovibrio*. Els valors de % GC escrit a la dreta de la mateixa taula posen de manifest que dos DNA amb un % GC igual o molt semblant poden no presentar homologia.

TAULA 2. — Tant per cent d'homologia entre els DNA de diverses soques de *Bdellovibrio*

Parells de soques a / b de <i>Bdellovibrio</i>	% d'homologia entre el DNA de a i b	% d'homologia segons altres autors <sup>1, 2</sup>	% de GC dels DNA de a i b
A <sub>3</sub> /12W	23	—	43,5/43,7
UKi <sub>2</sub> /W	28,5	—	41,8/43,7
A <sub>3</sub> .12/UKi <sub>2</sub>	14	16	43,5/41,8
A <sub>3</sub> .12/3294	0	—	43,5/37,4
UKi <sub>2</sub> /3294	37	—	41,8/37,4
W/3294	32	—	43,7/37,4
100/A <sub>3</sub> .12	—	1	50/43,5
100/UKi <sub>2</sub>	—	0	50/41,8
100/109D	—	103	50/51

<sup>1</sup> Seidler et al. (1972).      <sup>2</sup> Seidler et al. (1969).

## DISCUSSIO

D'acord amb les dades del % GC (taula 1), el grup dels bdeHovibrions podria ésser dividit en tres subgrups diferents. Cadascun d'aquests subgrups estaria caracteritzat pel seu % GC. En aquest cas 49,5 % a 51 % (primer grup), 42 % a 44 % (segon grup) i 37 % a 38 % (tercer grup). Si el nostre estudi dels àcids nucleics s'hagués aturat en aquest punt, la formació dels tres subgrups sembla una conseqüència lògica. Però, com hem dit abans, la igualtat en % GC no suposa la homologia en la seqüència de bases en el DNA (taula 2). En canvi, una diferència important dels % GC entre dos DNA permet predir poca o gens homologia entre els dos àcids nucleics. SUEOKA (1961) estima que una diferència d'un 10 % entre els % GC del DNA de dos bacteris suposa l'existència de molts pocs fragments amb el mateix contingut de guanina i citosina i, per tant, és d'esperar molt poca homologia. Més tard DELEY<sup>5</sup> ha calculat que dos DNA

que difereixin en un 16 % GC poden tenir en comú com a màxim un 4 % de les seves seqüències de nucleòtids.

Així, doncs, ja sense fer les homologies dels DNA de *Bdellovibrio* 3294 (37 % GC) i de *Bdellovibrio* 109D (51 % GC), podem saber que la semblança serà molt magra o no existirà en absolut. Les soques *Bdellovibrio* 100 (50 % GC) i 109D (51 % GC) presenten un 100 % d'homologia com varen demostrar SEIDLER et al.<sup>22</sup>. Aquest resultat s'ajusta a l'esperat entre dos bacteris amb el mateix contingut de GC i morfologia i cicle vital idèntics. La conclusió no es pot estendre a tots els casos. Així, *Bdellovibrio* A3.12 (43,5 % GC) i *Bdellovibrio* UK12 (42 % GC) solament tenent un 16 % d'homologia i en canvi els % GC són quasi iguals. És a dir, els percentatges de guanina i citosina molt diferents poden ésser útils per separar soques. Pel contrari, els % GC molt semblants no poden fer-se servir per establir grups dintre un conjunt de soques idèntiques en estructura i proves bioquímiques.

Segons les dades del % GC i homologies presentades en aquest treball, les tres espècies de *Bdellovibrio* descrites per SEIDLER et al.<sup>22</sup>: *Bdellovibrio bacteriovorus*, *Bdellovibrio starrii* i *Bdellovibrio stolpii*, s'haurien d'ampliar en dues més. Aquestes noves espècies estarien representades per les soques 3294 i W a les quals caldria posar noms específics. Encara no hem mesurat l'homologia de les soques que hem aïllat a Catalunya amb altres de semblant % GC, per exemple *Bdellovibrio* 109D de Califòrnia. Potser hi trobarem molta semblança, però no podem predir res encara, vist el resultat obtingut amb les altres soques del Japó i Alemanya.

Però proposant només noves espècies podem quedar-nos curts. Així BRENNER et al.<sup>2</sup> treballant amb enterobacteriàcies fixen la xifra de 70 % d'homologia per poder incloure dues soques dins un mateix gènere de bacteris. En el cas dels bdellovibrions i seguint aquestes indicacions hauríem de formar nous gèneres i separar-los de *Bdellovibrio*, puix molts cops les homologies entre soques no arriben ni al 30 %. Seguint l'ortodòxia vigent i l'esperit del *ego sum*, la «lleï» em protegiria pel fet d'establir diversos gèneres dins una família de bacteris que en podríem dir «Bdellovibrinàcies». No crec que sigui aquest el camí per aportar quelcom de positiu a la classificació dels bacteris.

En el cas de *Bdellovibrio* i en d'altres que exposarem més endavant, crec que hem arribat a un punt en què cal preguntar-se el significat dels estudis d'homologia d'àcids nucleics i si realment aquests tipus de mesures poden aclarir una mica les classificacions bacterianes. Un fet és evident: l'estudi de l'homologia entre dos àcids nucleics ens dóna una imatge prou bona per poder comparar les seqüències de bases en els DNA i els RNA. Això sens dubte té un gran valor per a l'estudi fi de dos genomes bacterians. Però... fins a quin punt poden fer servir aquestes dades

per ordenar els bacteris en una classificació el més filogenètica possible?

Quan parlem d'un 0% d'homologia entre dos DNA no vol dir que els àcids nucleics siguin completament diferents quant a seqüència de bases. Com ja s'ha dit en la introducció, les tècniques emprades estan a un nivell fenètic i no estrictament genotípic. Per tant, un 0% d'homologia només vol dir una poca semblança molt acusada.

El caràcter haploide del genoma bacterià (deixem a part alguns artefactes de laboratori) i la no repetició dels seus cistrons, excepte alguns pel rRNA i algun altre<sup>10</sup> fan que un canvi en la molècula del DNA dels bacteris representi una modificació més important en el conjunt del genoma que no pas el mateix canvi en l'àcid nucleic d'una cèl·lula eucariòtica. El genoma d'un eucariota com a mínim és diploide i en ell molts cistrons estan repetits moltes vegades. En altres paraules podríem dir que el genoma d'un eucariota està molt més tamponat que el d'un bacteri envers els canvis de bases o de fragments de DNA.

Suposem per un moment que les dades d'homologia entre DNA ens donen una idea ferma del parentiu filogenètic entre dos bacteris des d'un punt de vista evolutiu, el cas dels bdel·lovibrions i d'altres de ben coneguts, com els dels bacils esporulats grampositius inclosos en el gènere *Bacillus*, podria ser un exemple de convergència evolutiva. La forma de vida tipus «bdel·lovibrió» seria el resultat de l'evolució fins al parasitisme intracel·lular de diverses formes bacterianes genèticament allunyades. És a dir, d'entre la gran diversitat de bacteris aerobis primitius, algunes línies haurien arribat en el curs de l'evolució a un tipus de vida «bdel·lovibrió». Les formes actuals amb un contingut i seqüència de bases molt diferents provindrien de línies independents.

Des d'un punt de vista d'evolució en els éssers vius eucariotes, aquesta sembla ser una conseqüència lògica si considerem les semblances en l'estructura cel·lular i el cicle vital dels bdel·lovibrions d'una banda i les diferències en el DNA de l'altra. El grup de *Bacillus* amb un % GC de 32 a 62 és tant o més divers que el dels bdel·lovibrions, segons va demostrar TAKAHASHI et al.<sup>27</sup> amb experiments d'hidridació de DNA. No crec que en bacteriologia tots els casos que semblen poder-se interpretar com a convergències ho siguin en realitat. Penso que hi ha una altra possibilitat per explicar la semblança morfològica i la diversitat genòmica que es troba en soques de bacteris molt semblants. Com hem dit a la introducció, les possibilitats de canvis, fins i tot dràstics, del genoma dels bacteris semblen cada dia més evidents. Imaginem-nos per un moment que les seqüències de bases en el DNA d'un cistró poden variar mentre els canvis no afectin la funció de la proteïna codificada, però siguin suficients per impedir l'aparellament de les cadenes del DNA en els experiments

d'homologia. Si això és veritat, les mesures d'homologia haurien de donar uns tants per cents molt baixos, puix l'aparellament de les cadenes senzilles de DNA depèn de la semblança global en la seqüència de bases dels fragments que interaccionen. Vegem en dos exemples la possibilitat d'aquesta situació.

Per tal de digerir les proteïnes de l'hoste, els *Bdellovibrions* sintetitzen i segreguen fora de la cèl·lula molts tipus de proteases, entre elles, serin-proteases. Malhauradament no es coneixen les seqüències d'aminoàcids d'aquests enzims a *Bdellovibrio*, però si les d'algunes serin-proteases de membres del gènere *Bacillus*. SMITH et al.<sup>23</sup> varen analitzar les seqüències de la serin-proteasa (subtilisina) de dues soques de *Bacillus subtilis*. Els resultats indicaren que la subtilisina de *Bacillus subtilis* BPN era molt diferent de la de *Bacillus subtilis* Carlsberg. A causa de la composició diferent d'aminoàcids, aquests tipus d'enzims són separables mitjançant electroforesi. Així s'ha fet en el cas de les serin-proteases de *Bdellovibrio*<sup>7</sup> que també donaren motilitats electroforètiques diferents. Això fa suposar que les seqüències d'aminoàcids de les serin-proteases dels *Bdellovibrions* també siguin diferents. És a dir, mentre la funció de l'enzim, en aquest cas una proteasa, no resulti perjudicada, la constitució nucleotídica del segment de DNA codificada pot experimentar modificacions que condueixin a aminoàcids diferents en la cadena polipeptídica.

En el cas dels citocroms, AMBLER et al.<sup>1</sup> comprovaren que dins d'una espècie de gènere *Pseudomonas*, les diferències d'aminoàcids en un determinat citocrom eren més grans que les que s'observen a la mateixa proteïna entre diferents animals i plantes.

Alguns autors pensen que hi ha parts del DNA més estables i rebeques als canvis. Això s'ha comprovat en els cistrons que codifiquen la síntesi del rRNA. El conjunt d'aquests cistrons, tot i que alguns estan repetits de sis a deu vegades en el genoma d'un bacteri, no representa més del 4 % del total del DNA. DOI et al.<sup>6</sup>, MOORE et al.<sup>17</sup> i d'altres trobaren que la seqüència de bases en els cistrons del rRNA era la mateixa quan es comparen espècies bacterianes de gèneres diferents. Tanmateix, aquest fet no és general, puix TAKAHASHI et al.<sup>28</sup> treballant amb *Bacillus* i SEIDLER et al.<sup>22</sup> treballant amb *Bdellovibrio* han trobat que la seqüència de bases dels cistrons que codifiquen el rRNA no és la mateixa fins i tot en soques bacterianes incloses dins un mateix gènere. Si en sentit filogenètic acceptem els *Bacillus* i els *Bdellovibrio* com a grups naturals de bacteris podem concloure que al llarg de l'evolució dels microorganismes els fragments de DNA que codifiquen el rRNA no han quedat «congelats» i presenten variabilitat àdhuc entre soques de bacteris molt semblants. Així, doncs, no tots els rRNA, per fer la seva funció a

nivell de ribosoma, necessiten tenir la mateixa seqüència de nucleòtids. De primer moment sembla que pel fet d'ésser el ribosoma un òrganul tan uniforme quant a estructura i funció, el RNA ribosòmic hauria de tenir la mateixa seqüència de nucleòtids en tots els bacteris actuals. S'ha suggerit la possibilitat que podrien existir en una mateixa cèl·lula diversos tipus de ribosomes amb funcions diferents encara que sempre per a sintetitzar proteïnes. Això de moment no s'ha comprovat i per tant cal pensar en la uniformitat d'estructura i funció dels ribosomes. Actualment hom creu, amb bons fonaments, que el rRNA no actua com a missatger per les mateixes proteïnes del ribosoma. En cas que el rRNA fes de mRNA per aquestes proteïnes, la seva informació no abastaria a codificar la síntesi de totes elles, sinó solament d'una quarta part. La funció del rRNA sembla més «enzimàtica» o «estructural» que no pas codificadora. Per tant és possible imaginar fragments d'aquest rRNA molt necessaris per a la funció de la molècula i d'altres trossos on els canvis de bases no tinguin tanta transcendència.

Així, doncs, veiem que, en el món dels procariotes, la variabilitat de bases en el DNA quan es comparen bacteris molt semblants es dona no solament en els cistrons de proteïnes enzimàtiques, sinó fins i tot en els que codifiquen el rRNA. A part d'aquestes diferències de bases d'acció directa sobre la constitució de les proteïnes, també pot haver-hi diferències degudes a la degeneració del codi genètic.

Amb aquestes evidències i des d'un punt de vista evolutiu queda plantejada la dificultat de la interpretació de les dades d'homologia entre àcids nucleics de bacteris. ¿No serà que així com a les plantes i animals superiors hi ha taxònoms que van darrera les formes per a descriure noves entitats sistemàtiques a nivell d'espècie, en els bacteris el biòleg molecular té un mecanisme —les homologies entre DNA—, per a descriure infinitat de noves espècies? De tot això es deduiria que la mesura de l'homologia entre genomes bacterians pel que respecta a la classificació no pot tenir el mateix valor que l'homologia entre DNA d'éssers superiors. Crec que en els bacteris les dades d'homologies no tenen tant de valor per a establir classificacions naturals com alguns autors volen donar-los-hi. Si ho acceptem així, les diferències en les homologies de DNA de bacteris molt semblants foren una prova de les possibilitats de diversificació dels genomes bacterians tot i conservant-se les mateixes estructures i funcions.

Potser la resposta a l'alternativa convergència envers diversificació es troba en la valoració del nombre i importància dels caràcters que es comparen (acció evidentment subjectiva). De fet, si agafem el concepte de convergència evolutiva en el nivell morfològic en els eucariotes també podem aplicar-lo a certes semblances entre grups de bacteris. Per exemple, molts bacteris que viuen adherits a sòlids a les aigües tenen una

estructura, la prosteca, que els subjecta al substrat. Aquesta estructura, tot i acomplint la mateixa funció, és produïda per grups de bacteris molt llunyans genèticament. Així, doncs, podem considerar aquest exemple com un cas de convergència en la funció de subjectar el bacteri al substrat. Un altre exemple el constitueixen tots els bacteris que en un moment del seu cicle vital produeixen una estructura útil a la propagació de l'espècie i més o menys resistent a la deshidratació: les espores i els cists bacterians. En aquestes estructures fins i tot hi ha semblances molt notables (nombre i disposició de les capes que constitueixen el cist o l'espóra), però la semblança mai no arriba a una identitat absoluta de la naturalesa química de les macromolècules que constitueixen les diferents capes. Així per exemple, alguns bacteris oxidadors del metà produeixen unes espores extraordinàriament semblants a les dels *Bacillus*, però hi manca l'àcid dipicolínic, constituent típic i universal de les espores dels *Bacillus* aïllats a la natura<sup>31</sup>.

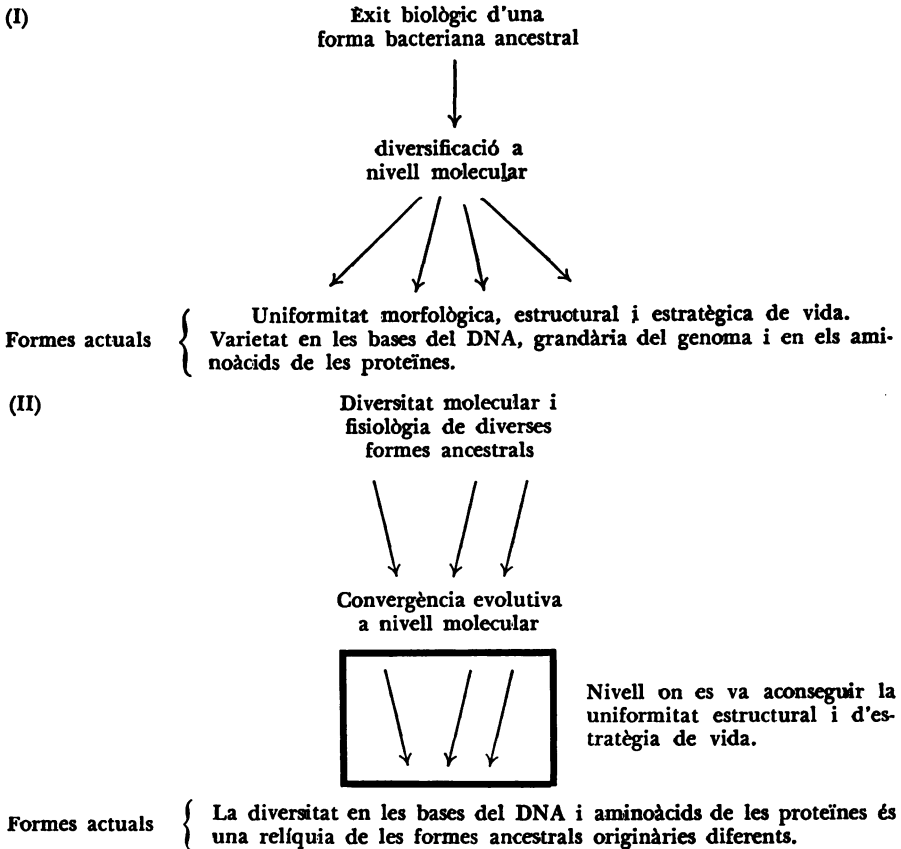
Queda com a una incògnita si en el món bacterià les convergències varen arribar a igualar no solament les funcions, sinó també la bioquímica íntima de les estructures macromoleculares (membranes, parets, tipus de flagell) que sostenen aquestes funcions. Això hauria passat en el cas dels *Bdellovibrio* i dels *Bacillus*. Si en lloc d'usar el terme «convergència», que pot tenir un cert regust lamarckià, utilitzem el de «coincidència», potser no es podrà negar que, del conjunt infinit de bacteris ancestrals, moltes línies en llocs diferents arribessin al llarg dels milions d'anys i de generacions a «coincidir» exactament en la mateixa bioquímica estructural i funcional. Aquesta és una possibilitat difícil de comprendre potser, però que no es pot negar.

Vegem un altre aspecte en l'estudi dels genomes bacterians. La grandària del genoma dels bacteris s'ha fet servir també per separar espècies. En el cas dels *Bdellovibrions* trobem un conjunt de soques amb un DNA de pes molecular mitjà igual a  $1330 \times 10^6$  uma (*Bdellovibrio* 3294, W i 109D). El DNA de la soca *Bdellovibrio* UK12 pesa  $1490 \times 10^6$  uma i el de *Bdellovibrio* A3.12  $1700 \times 10^6$  uma. Entre el genoma més gran i el més petit hi ha una diferència de  $370 \times 10^6$  uma. Aquesta és una xifra considerable, però BRENNER et al.<sup>2</sup> analitzant la grandària del genoma de moltes soques d'*Escherichia coli* de diferent origen obtingueren diferències de fins  $670 \times 10^6$  uma. En els bacteris, molts elements cromosòmics tipus plàsmid tenen pesos moleculars de  $70 \times 10^6$  uma i més<sup>3</sup>. Per exemple, el plàsmid ColVBtrp té un pes molecular de  $107 \times 10^6$  uma i correspon a un 5% de cromosoma de l'hoste (*Escherichia coli*). Se sap que molts d'aquests elements es poden integrar en el cromosoma dels bacteris i ésser transferits a la natura i al laboratori d'unes cèl·lules a les altres. Així, doncs, l'origen d'una diferència de pes molecular considerable pot ser explicada si



es pensa en la possibilitat que un cromosoma bacterià hagi intercanviat i incorporat diversos fragments de DNA al llarg de l'evolució. Dintre de certs límits, les diferències de grandària de genoma no semblen barres infranquejables des d'un punt de vista evolutiu.

FIG. 5. — Esquema de dues possibilitats d'evolució en els bacteris (situació idealitzada).



A la figura 5 s'han caricaturitzat les dues possibilitats extremes d'evolució en el món bacterià discutides més amunt. És possible que totes dues s'hagin donat en una mateixa línia de descendència al llarg dels milions d'anys des que els bacteris aparegueren a la terra. La hipòtesi de la diversificació (I) recolza en les possibilitats de variació del material genètic, l'antiguitat dels bacteris i les possibilitats d'isolament. En aquest cas, la mutació es veu com a font de diversificació mentre que l'intercanvi de

trossos grans de DNA entre bacteris que conviuen en un mateix lloc seria una força que tendiria a la uniformització dels genomes. En el cas dels bdeHovibrions podem pensar en isolaments deguts al macrohàbitat «inorgànic» (bdeHovibrions del sòl, d'aigües salobres, d'aigües dolces, del mar, etc.), però també en isolaments deguts al microhàbitat «orgànic», és a dir, a l'especialització d'hoste. Per exemple, les soques tipus A<sub>3.12</sub> solament ataquen els pseudomones i no ho fan amb els enterobacteris.

Si acceptem la hipòtesi de la convergència (II) a l'hora de pensar en un arbre filogenètic, les homologies entre els DNA de bacteris indicarien d'una manera quasi bé absoluta el parentiu ancestral entre dos bacteris. Així, doncs, recolzant-nos en les dades d'homologies podríem dir que els bdeHovibrions actuals provenen de línies evolutives separades. Són polifilètics.

Si pensem en l'ordenació sistemàtica dels bacteris mitjançant l'estudi d'hibridacions d'àcids nucleics i acceptem la hipòtesi de la convergència funcional, el futur de les classificacions bacterianes de base filogenètica és prou fosc. És possible que apareixin tantes línies evolutives diferents com soques de bacteris estudiats aïllats de llocs geogràfics llunyans. En canvi si s'accepta que les possibilitats de diversificació que afecten les bases moleculars del genoma en una línia bacteriana poden ésser importants, la significació de les homologies per a establir parentiu natural no serà tan gran. En aquest cas, homologies diferents indicarien manca de contacte entre línies bacterianes més que no pas l'origen polifilètic de les soques. El gènere de bacteris estaria format per grups de soques amb caràcters morfològics, estructurals (incloent-hi la composició i arquitectura bioquímica de parets i membranes) i fisiològics que conjuntament constituïren l'estratègia de vida d'aquests bacteris. Dins d'aquest tipus de grup natural de soques les homologies d'àcids nucleics podrien variar des d'un 0% a un 100%.

Des del meu punt de vista crec que la situació que presenten els bdeHovibrions, els *Bacillus* i d'altres bacteris no esmentats s'adapta més a un model tipus I (diversificació del genoma) encara que no veig com es pot negar absolutament la possibilitat representada pel model tipus II (convergència estructural i funcional).

Però mentre alguns grups de bacteris es presten a aquests tipus de discussions, altres com les enterobacteriàcies no ofereixen una situació tan clara, puix que les diferències de morfologia i estructura són quasi inexistent. Per aquest motiu el valor que alguns bacteriòlegs donen a les homologies en aquest grup és molt gran i donen per segur que l'aparellament entre dos DNA és una bona dada de base filogenètica. Crec que en aquests grups de bacteris s'ha d'anar molt amb compte abans de donar un valor filogenètic a les dades d'homologies entre àcids nucleics.

Encara que la situació en *Bacillus* i *Bdellovibrio* pot ésser pensada com un cas concret en el món dels bacteris, sens dubte constitueix un model que pot donar llum a la comprensió dels mecanismes evolutius en el nivell d'organització procariòtica.

**AGRAÏMENTS:** Vull agrair al Prof. Ricard Guerrero, del Dept. de Microbiologia de la Facultat de Ciències de la Universitat Autònoma de Barcelona tot l'encoratjament i ajuda que m'ha donat. Sota la seva direcció porto a terme estudis sobre l'ecologia dels bdellovibrions. També dec la meva reconeixença al Prof. R. J. Seidler per la seva amabilitat durant la meva estada al seu laboratori a la Universitat de l'Estat d'Oregon (USA), on s'ha fet part d'aquest treball. Els comentaris al manuscrit fets pels meus companys Carles Cases, del Dept. de Microbiologia, i Ferran Rodà del Dept. d'Ecologia de l'Universitat Autònoma han estat de molta utilitat.

#### BIBLIOGRAFIA

1. AMBLER, R. P. i WYNN, M. — *Species differences in the aminoacid sequences of bacterial proteins*. In: Chemotaxonomy and Serotaxonomy, ed. J. G. Hawkes, pp. 57-64. London: Academic Press (1968).
2. BRENNER, D. J., FANNJNG, G. R., SKERMAN i FALKOW, S. — *Polinucleotide sequence divergence among strains of Escherichia coli and closely related organism*. «J. Bacteriol.», 109: 953-965 (1972).
3. BUCHANAN, R. E. i GIBBONS, N. E. — *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The Williams and Wilkins Co. Baltimore (1974).
4. BURGER, A., DREWS, G. i LADWING, R. — *Wirstkreis und Infektionscyclus eines neu isolierten Bdellovibrio bacteriovorus-Stammes*. «Archiv für Mikrobiologie», 61: 261-279 (1968).
5. DELEY, J. — *Compositional nucleotide distribution and the theoretical prediction or homology in bacterial DNA*. «J. Theor. Biol.», 22: 89-116 (1969).
6. DOY, R. J. i IGARASHI, R. T. — *Conservation of ribosomal and messenger ribonucleic acid cistrons in Bacillus species*. J. Bacteriol., 90: 384-390 (1965).
7. GLOOR, L.; KLUBEK, B. i SEIDLER, R. J. — *Molecular heterogeneity of the bdellovibrions: Metallo and serine proteases unique to each species*. «Arch. Microbiol.», 95: 45-56 (1974).
8. HELINSKI, D. R. — *Plasmid determined resistance to antibiotics: molecular properties of R factors*. «Ann. Rev. Microbiol.», 27: 437-470 (1973).
9. HICKSON, F. T., ROTH, T. F. i HELINSKI, D. R. — *Circular DNA forms of a bacterial sex factor*. «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 58: 1731-1738 (1967).
10. JASKUNAS, S. R.; LINDAL, L. i NOMURA, N. — *Identification of two copies of the gene for the elongation factor EF-Tu i E. coli*. «Nature», 257 (5526): 458 (1975).
11. LACY, G. H. i LEARY, G. V. — *Transfer of antibiotic resistance plasmid RP1 into Pseudomonas glycinea and Pseudomonas phaseolicola in vitro and in planta*. «J. Gen. Microbiol.», 58: CF-LS (1975).
12. MANDEL, M. — *New approaches to bacterial taxonomy: perspectives and projects*. «Ann. Rev. Microbiol.», 23: 239-274 (1969).

13. MANDEL, M.; IGAMBI, L.; BERGENDAHL, J. i DODSON, M. L. (JR.) — *Correlation of melting temperature and CsCl buoyant density of bacterial DNA*. «J. Bacteriol.», 101: 333-338 (1970).
14. MARMUR, J. — *A procedure for the isolation of DNA from microorganisms*. «J. Mol. Biol.», 3: 208-218 (1961).
15. MARMUR, J. i DOTY, P. — *Determination of the base composition of DNA from its thermal denaturation temperature*. «J. Mol. Biol.», 5: 109-118 (1962).
16. MITSUHASHI, S. — *Epidemiology and genetics of R. factors*. «Annals of the New York Academy of Science», 182: 141-152 (1971).
17. MOORE, R. L. i MCCARTHY, B. J. — *Comparative study of ribosomal ribonucleic acid cistrons in enterobacteria and mycobacteria*. «J. Bacteriol.», 94: 1066-1074 (1967).
18. SEIDLER, R. J. i STARR, M. P. — *Factors affecting the intracellular parasitic growth of Bdellovibrio bacteriovorus developing within Escherichia coli*. «J. Bacteriol.», 97: 912-923 (1969).
19. SEIDLER, R. J. i STARR, M. P. — *Isolation and characterization of H-I bdellovibrios*. «J. Bacteriol.», 100: 769-785 (1969).
20. SEIDLER, R. J., STARR, M. P. i ANDEL, M. — *Deoxyribonucleic acid characterization of bdellovibrios*. «J. Bacteriol.», 100: 786-790 (1969).
21. SEIDLER, R. J., i MANDEL, M. — *Quantitative aspects of deoxyribonucleic acid characterization: base composition, state chromosome replication and polynucleotide homologies*. «J. Bacteriol.», 106: 608-614 (1971).
22. SEIDLER, R. J., MANDEL, M. i BAPTISTS, J. N. — *Molecular heterogeneity of the bdellovibrios: evidence of two new species*. «J. Bacteriol.», 109: 209-217 (1972).
23. SMITH, E. L. ET AL. — Citat a M. MANDEL, 1969 (1966).
24. SNEATH, P. H. A. — *Phylogeny of microorganisms*. In M. J. Carlile and J.J. Shekel. «Evolution in the Microbial World», 24 Symp. S.G.M. pp. 1-39. Cambridge University Press, Cambridge (1974).
25. STARR, M. P. i HUANG, H. — *Physiology of the bdellovibrios*. «Adv. Microbial. Physiol.», 8: 215-257 (1972).
26. STARR, M. P. i SEIDLER, R. J. — *The bdellovibrios*. «Ann. Rev. Microbiol.», 25: 650-674 (1971).
27. TAKAHASHI, H.; SAITO, H. i IKEDA, Y. — *Genetic relatedness of spore bearing bacilli studied by the DNA agar method*. «J. Gen. Appl. Microbiol.», 12: 113-118 (1966).
28. TAKAHASHI, H.; SAITO, H. i IKEDA, Y. — *Species specificity of the ribosomal RNA cistrons in bacteria*. «Biochem Biophys. Acta», 134: 124-133 (1967).
29. TAYLOR, V. I.; BAUMANN, P.; REICHEL, J. L. i ALLEN, R. D. — *Isolation, enumeration and host range of marine bdellovibrios*. «Arch. Microbiol.», 98: 101-114 (1974).
30. WEINBER, S. R. i SOTZKY, G. — *Conjugation and genetic recombination of Escherichia coli in soil*. «Soil Biology Biochemistry», 4: 171-180 (1972).
31. WILKINSON, J. F. — *Hydrocarbons as a source of single cell protein*. In D. E. Hughes and A. H. Rose, «Microbes and Biological Productivity» 21st Symp. S.G.M. pp. 15-46. Cambridge University Press., Cambridge (1971).